

**Speicherung von Adrenalin
und Noradrenalin
im Meerschweinchenherzen**

Klaus Schnell

1965

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität
Frankfurt am Main

Direktor: Prof. Dr. med. P. H o l t z

SPEICHERUNG VON ADRENALIN UND NORADRENALIN

IM MEERSCHWEINCHENHERZEN

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin der
Hohen Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang
Goethe-Universität zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

K l a u s S c h n e l l
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 1964

Dekan : Prof. Dr. med. H. F r i c k

Referent : Prof. Dr. med. H. J. Schümann

Korreferent : Prof. Dr. med. E. F. P f e i f f e r

Tag der mündlichen Prüfung : 25. Januar 1965

I n h a l t

Einleitung

Methodik

1. Herstellung von Herzhomogenaten
2. Extraktion und Anreicherung der Brenzcatechinamine
3. Fluorimetrische Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin
4. Kolorimetrische Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin
5. Inkubation
6. Verwendete Substanzen

Ergebnisse

- I. Subzelluläre Verteilung der Brenzcatechinamine des Herzens und ihre Beeinflussung durch Reserpin und Guanethidin
 1. Fraktionierung der Herzhomogenate
 2. Verteilung der Brenzcatechinamine
 3. Wirkung von Reserpin und Guanethidin
- II. Freisetzung von Brenzcatechinaminen aus isolierten Herzgranula im Vergleich zu Nebennierenmark- und Milznervengranula
 1. Vorbemerkung
 2. Temperaturabhängige Spontanfreisetzung
 3. Osmotische Lyse
 4. Calcium und Magnesium
 5. Ribonuclease
 6. Segontin
 7. Acetylcholin

Diskussion

Zusammenfassung

Literatur

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

E i n l e i t u n g

Das Herz aller bisher untersuchten Säugetiere, auch das des Menschen, enthält neben kleinen Mengen Adrenalin Noradrenalin als sympathischen Überträgerstoff (v. E u l e r; H o l t z, K r o - n e b e r g und S c h ü m a n n; M c G o o d a l l; H ö k - f e l t). Wie in anderen sympathisch innervierten Organen kann auch im Herzen Noradrenalin gebildet werden. So erhielten M u s a c c h i o und G o l d s t e i n bei der Durchströmung isolierter Kaninchenherzen mit ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -Dopamin radioaktives Noradrenalin, radioaktives Adrenalin konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Auch in vivo synthetisiert das Herz nach Untersuchungen von K o p i n und G o r d o n den größten Teil seines Noradrenalins selbst. Annähernd 80 % werden im Herzen gebildet, und nur etwa 20 % werden als fertiges Noradrenalin aus dem zirkulierenden Blut aufgenommen.

Es besteht eine charakteristische Verteilung der Amine auf die einzelnen Herzabschnitte. Die höchste NoradrenalinKonzentration findet sich im rechten Vorhof, eine niedrigere im linken; dann folgen rechter und schließlich linker Ventrikel (M u s c h o l l; K l o u d a). Mit Hilfe einer histologischen Fluoreszenzmethode zeigten A n g e l a k o s, F u x e und T o r c h i a n a, daß der Amingehalt der verschiedenen Herzabschnitte gut mit ihrer unterschiedlich starken, sympathischen Innervation übereinstimmt. Es wird deshalb angenommen, daß das Noradrenalin des Herzens vorwiegend in den postganglionären, sympathischen Nerven lokalisiert ist. Dafür sprechen auch chronische Denervierungsversuche: das Herz verliert nach postganglionärer, sympathischer Denervierung, die bekanntlich mit einer Degeneration der sympathischen Fasern einhergeht, mehr als 85 % seiner Amine (M c G o o d a l l).

Wenn der überwiegende Teil des Noradrenalins in den postganglionären, sympathischen Nervenfasern des Herzens vorkommt, so müßte es im Herzen, ähnlich wie in den sympathischen Milznerven (v. E u l e r; S c h ü m a n n 1958a), in besonderen Zellorganellen, sogenannten Granula, gespeichert werden. K a k o und W e g m a n n sowie P o t t e r und A x e l r o d

konnten an Hunde- bzw. an Rattenherzen zeigen, daß ein großer Teil der Brenzcatechinamine an eine partikuläre Fraktion gebunden ist.

In der vorliegenden Arbeit wird die Speicherung von Noradrenalin und Adrenalin im Meerschweinchenherzen untersucht und das Verhalten der aus Herzhomogenaten isolierten, aminspeichernden Partikel mit demjenigen von Milznervengranula und Nebennierenmarkgranula verglichen.

M e t h o d i k

1. Herstellung von Herzhomogenaten. Meerschweinchen wurden durch Nackenschlag getötet, die Herzen sofort entnommen und in eiskalte 0,3 M Saccharoselösung gegeben, wo sie nach wenigen Schlägen stehen blieben, ohne daß Herzflimmern auftrat. Hierauf wurden Pericard und Gefäßstümpfe abpräpariert, die Herzen aufgeschnitten, mit Fließpapier abgetupft und gewogen. Je 3 g Herzgewebe wurden bei 0°C unter 3 ml 0,3 M Saccharoselösung 5 min mit der Schere zerschnitten, sodann in insgesamt 12 ml Saccharoselösung suspendiert und 15 sec mit einem Ultra-Turrax (Fa. Jahnke & Kunkel, Staufen i. Br.) homogenisiert. Durch weitere Zugabe von Saccharoselösung wurde das Homogenat so verdünnt, daß schließlich auf 1 g Herz 10 ml Saccharoselösung kamen. Für jeden Versuch wurden 9 - 15 g Herzgewebe verwendet.

2. Extraktion und Anreicherung der Brenzcatechinamine. Die durch Differentialzentrifugieren aus Herzhomogenaten gewonnenen Sedimente wurden mit 0,4 n Perchlorsäure - Sediment 2 000 g mit 80 ml, Sediment 15 000 g und 100 000 g mit je 20 ml - extrahiert und der Überstand mit konzentrierter Perchlorsäure (3,8 ml 70 %iger Perchlorsäure/ 100 ml) versetzt. Die als Kontrolle dienenden nicht fraktionierten Herzen wurden nach Präparation und Einwaage sofort unter 10 ml 0,4 n Perchlorsäure/ g Herz homogenisiert. Nach 30 min langer Extraktion bei 0°C wurden die Perchlorsäureextrakte zentrifugiert und das ausgefällte Eiweiß in den so erhaltenen Niederschlägen nach K j e l d a h l bestimmt. Die Brenzcatechinamine in den perchlorsauren Überständen wurden durch Adsorption an Aluminiumoxyd angereichert, nachdem zuvor der größte Teil der Perchlorate durch Zugabe von 20 %iger

Kaliumkarbonatlösung bei 0°C und pH 4 ausgefällt worden war.

Zu je 10 ml Extrakt wurden 0,25 g Aluminiumoxyd und 0,1 g EDTA gegeben und der Extrakt mit 2 %iger Natronlauge unter ständigem Rühren auf pH 8,5 eingestellt. Hierbei werden die Brenzcatechinamine an das suspendierte Aluminiumoxyd adsorbiert. Nach 7 min wurde das Aluminiumoxyd-EDTA-Gemisch aus den Extrakten abfiltriert und die Brenzcatechinamine mit 1 ml 0,25 n Salzsäure/ 0,25 g Aluminiumoxyd eluiert. Der Brenzcatechinamingehalt der Eluate wurde fluorimetrisch nach v. Euler und Floding bestimmt. (siehe Methodik 3)

Die Ausbeute betrug im Mittel bei Adsorption aus Wasser für Adrenalin $63,6 \pm 1,3 \%$, für Noradrenalin $60,0 \pm 1,4 \%$ ($n = 25$, Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes). Der " Internal Standard " für Noradrenalin zeigte mit $62,8 \%$ Ausbeute eine gute Übereinstimmung mit diesem Wert. Wie ein Versuch mit Noradrenalin ergab, ist die Ausbeute abhängig von der Konzentration des zu adsorbierenden Brenzcatechinamins. Innerhalb des von uns verwendeten Konzentrationsbereiches von $2,5 - 10,0 \mu\text{g}$ Noradrenalin/ 100 ml kann sie jedoch als praktisch konstant angesehen werden (Abb. 1). - In der vorliegenden Arbeit wurden die nicht-korrigierten Werte angegeben.

3. Fluorimetrische Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin.

Prinzip. Die bei der fluorimetrischen Adrenalin- und Noradrenalinbestimmung ablaufenden chemischen Umsetzungen sind von Lund weitgehend aufgeklärt worden. Adrenalin wird durch Kaliumferricyanid zu dem entsprechenden Chinon und unter Bildung eines Indolringes weiter zu Adrenochrom oxydiert. In Gegenwart starker Alkalien wandelt sich Adrenochrom zu Adrenolutin, einem Trihydroxyindol (Abb. 2), um. Entsprechendes gilt für Noradrenalin, wobei Noradrenolutin entsteht.

Ausführung. Der Adrenalin und Noradrenalingehalt der Eluate wurde fluorimetrisch in Anlehnung an die von v. Euler und Floding angegebene Methode bestimmt. - Zu 1 ml 1 M Acetatpuffer pH 6,0 gibt man einen aliquoten Teil des zu bestimmenden Eluates (maximal 0,5 ml), füllt mit destilliertem Wasser auf 1,5 ml Gesamtvolumen auf und oxydiert mit 0,1 ml 0,25 %iger Kaliumferri-

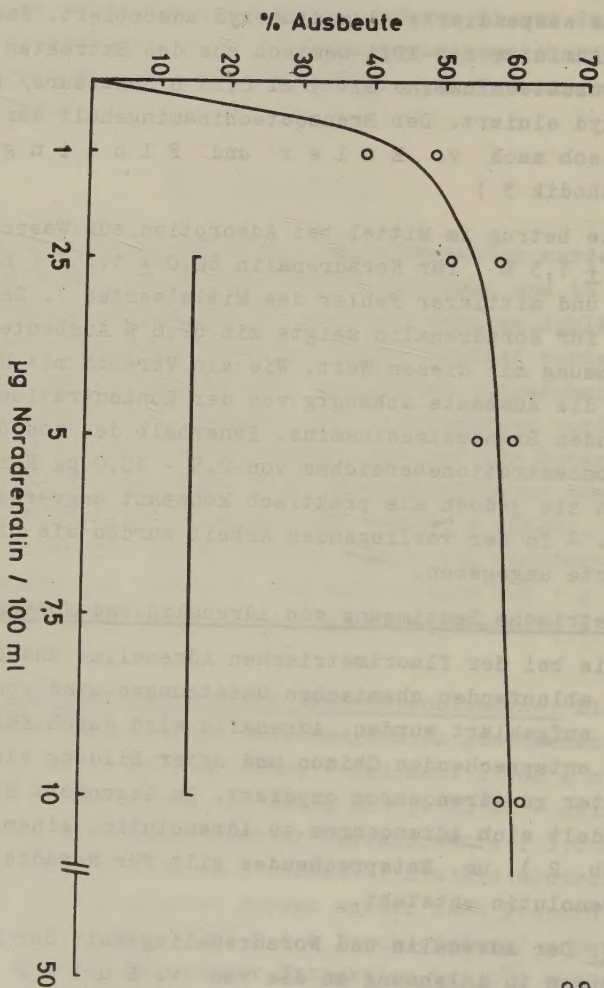
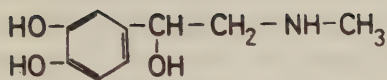
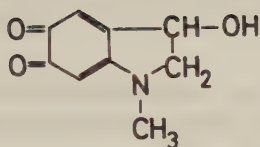


Abb. 1. Abhängigkeit der Ausbeute von der Konzentration des zu adsorbierenden Noradrenalins.
 Der in der Arbeit verwendete Konzentrationsbereich ist durch eine waagrechte Linie markiert.
 0 = Einzelmeßwert.



Adrenalin



Adrenochrom



Ketoform

Adrenolutin

Enlform

Abb. 2. Strukturformeln von Adrenalin, Adrenochrom und Adrenolutin

cyanidlösung bei pH 6,0. Nach 2 min wird die Oxydation durch Zugabe von 1,9 ml eines Natronlauge-Ascorbinsäure-Gemisches (9 Teile 20 %ige NaOH + 10 Teile 0,2 %ige Ascorbinsäure) unterbrochen und das Volumen des Ansatzes mit Wasser auf insgesamt 3,9 ml gebracht. Als Leerwert diente der nicht-oxydierte Ansatz, in dem Kaliumferricyanid nach dem Natronlauge-Ascorbinsäure-Gemisch zugesetzt wurde. Entsprechende Ansätze mit 0,3 µg Adrenalin bzw. Noradrenalin an Stelle des Eluates wurden als Standard verwendet.

Die Fluoreszenz erreicht nach 10 min ihr Maximum und bleibt dann für weitere 20 min konstant. Sie wurde durch monochromatisches Licht von 365 bzw. 436 mµ Wellenlänge angeregt und mit Hilfe eines Zeiss-Spektralphotometers PQM II mit Fluoreszenzzusatz ZMF 4 gemessen. Das fluoreszenzanregende Licht wurde durch entsprechende Sperrfilter (Fa. Schott & Gen.: Filter GG 13 bzw. VG 5, 2 mm Glasstärke) abgefangen.

Enthält ein Eluat ausschließlich Adrenalin oder Noradrenalin, so ergibt sich der Adrenalin- bzw. Noradrenaliningehalt des Eluates nach folgender Formel aus der bei 365 mµ gemessenen Fluoreszenz.

$$x = \frac{a F_{365}}{A_{365}}$$

x = µg Adrenalin bzw. Noradrenalin im Ansatz

a = µg Adrenalin bzw. Noradrenalin im Standard

F₃₆₅ = Nettofluoreszenz des Ansatzes bei 365 mµ

A₃₆₅ = Nettofluoreszenz des Standards bei 365 mµ

Eine zuverlässige Bestimmung von Adrenalin bzw. Noradrenalin ist innerhalb eines Meßbereiches von 0,02 - 0,5 µg / Ansatz möglich.

Bei Eluaten, die Adrenalin und Noradrenalin nebeneinander enthalten, kann man den Adrenalin- bzw. Noradrenaliningehalt des Eluates folgendermaßen berechnen.

$$y = \frac{a}{Q_{365} - Q_{436}} \left(\frac{F_{365}}{A_{365}} - \frac{F_{436}}{A_{436}} \right)$$

$$x = a \frac{F_{365}}{A_{365}} - Q_{365} y$$

- x = µg Adrenalin im Ansatz
 y = µg Noradrenalin im Ansatz
 a = µg Adrenalin im Standard
 F₃₆₅ ; F₄₃₆ = Nettofluoreszenz des Ansatzes bei 365 mµ ; 436 mµ
 A₃₆₅ ; A₄₃₆ = Nettofluoreszenz des Standards bei 365 mµ ; 436 mµ
 Q₃₆₅ ; Q₄₃₆ = Quotient der Nettofluoreszenzen Noradrenalin-/Adrenalinstandard bei 365 mµ ; 436 mµ.

Nach meinen Erfahrungen beträgt $Q_{365} = 1,22 \pm 0,04$ und $Q_{436} = 0,29 \pm 0,01$ (n = 20, Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes).

Papierchromatographische Kontrolluntersuchungen zur fluorimetrischen Differenzierung von Adrenalin und Noradrenalin. Zur Überprüfung der fluorimetrisch ermittelten Adrenalin- und Noradrenalinwerte wurden die beiden Brenzcatechinamine durch quantitative Papierchromatographie aufgetrennt und gemessen. 4 - 6 g Meerschweinchenherz je Versuch wurden mit Perchlorsäure extrahiert und die Brenzcatechinamine durch Adsorption an Aluminiumoxyd angereichert (siehe Methodik 2). 1/4 des Eluates wurde entnommen und darin der Adrenalin- und Noradrenalin Gehalt fluorimetrisch bestimmt. Der Rest des Eluates wurde im Vacuum bei 45°C zur Trockne gebracht und in 0,5 ml Salzsäure-Alkohol (85 Teile 96 %iger Äthanol + 15 Teile 1 n HCl) aufgenommen.

Zur Chromatographie wurde Papier Nr. 2043 b der Fa. Schleicher und Schüll verwendet, das vor Gebrauch 48 Std. in n/ 100 Salzsäure gewaschen und wieder getrocknet worden war. Das eingeeengte Eluat wurde in 7 cm Breite aufgetragen und unter Stickstoffatmosphäre 16 Std. lang in 85 % Phenol + 15 % n/ 10 Salzsäure ascendierend chromatographiert (V o g t). Nach Vortrocknen wurde das Chromatogramm mit Benzol gewaschen, erneut getrocknet, der Teststreifen abgetrennt und mit Kaliumferricyanid nach J a m e s angefärbt. Dem Adrenalin- und Noradrenalinleck des Teststreifens ent-

Tabelle 1 Papierchromatographische Kontrolle der fluorimetrisch ermittelten Adrenalin - Noradrenalinverteilung bei Meerschweinchenherzextrakten. Brenzcatechinamin in $\mu\text{g/g}$ Herz.

Versuch Nr.	Fluorimetrische Amin $\mu\text{g/g}$	Fluorimetrische Differenzierung		Papierchromatographie	
		Noradr. %	Adr. %	Noradr. %	Adr. %
1	1,83	90	10	90	10
2	1,79	91	9	88	12
3	1,35	84	16	89	11

entsprechende waagrechte Bahnen wurden ausgeschnitten, mit der Schere gut zerkleinert, 2 mal mit 30 ml n/ 50 HCl extrahiert, abermals eingeengt und Adrenalin und Noradrenalin getrennt gemessen. Die papierchromatographisch ermittelte Adrenalin- Noradrenalinverteilung stimmte gut mit der fluorimetrisch ermittelten überein (Tab. 1).

4. Kolorimetrische Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin.

Der Brenzcatechinamin (Adrenalin + Noradrenalin) -Gehalt isolierter Nebennierenmarkgranula wurde nach v. E u l e r und H a m b e r g bestimmt. - Zu 2 ml Citratpuffer (M c I l v a i n e) pH 6,0 wurde ein aliquoter Teil des zu bestimmenden Extraktes (maximal 1 ml) zugesetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 3,0 ml aufgefüllt. Durch Oxydation mit 0,3 ml n/10 Jodlösung werden Adrenalin bzw. Noradrenalin in das rotviolette Jodadrenochrom bzw. Jodnoradrenochrom überführt. Nach 3 min wird das überschüssige Jod mit 0,6 ml n/20 Natriumthiosulfatlösung entfernt und die Extinktion der Farblösung mit Hilfe eines Spektralphotometers bei 529 m μ Wellenlänge gemessen. Da gleiche Mengen von Adrenalin und Noradrenalin identische Extinktionen ergeben, kann der Brenzcatechinamingehalt auf einer Adrenalineichkurve abgelesen werden.

5. Inkubation. Granula aus 2 g Meerschweinchenherz, 2 g Rindermilznerven bzw. 70 mg Rindernebennierenmark wurden durch Differentialzentrifugieren gewonnen (siehe auch S c h ü m a n n und W e i g m a n n; S c h ü m a n n 1958a) und in 3,5 ml isotonischer Saccharoselösung (0,3 M mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt) suspendiert. Die Granula der nicht inkubierten Kontrollansätze (0°C, 0 min) wurden sofort durch 30 min langes Zentrifugieren mit 15 000 g bei Nebennierenmarkgranula, 30 000 g bei Milznervengranula und durch 45 min langes Zentrifugieren mit 100 000 g bei Herzgranula niedergeschlagen, der Überstand abgegossen und die sedimentierten Granula mit 3 ml 0,4 n Perchlorsäure 15 min lang extrahiert. Die Kontrollansätze und die Versuchsansätze wurden in 25 ml Erlenmeyerkölbchen bei 22°C unter ständigem Schütteln (Frequenz 100/ min) inkubiert, nach der Inkubation sofort auf 0°C abgekühlt, quantitativ in Zentrifugenröhrchen übertragen, die Granula mit entsprechender g-Zahl abzentrifugiert und ebenfalls mit Perchlorsäure extrahiert. Der Brenzcatechinamingehalt wurde

bei Nebennierenmarkgranula kolorimetrisch nach v. Euler und H a m b e r g , bei Herz- und Milznervengranula fluorimetrisch nach v. Euler und F l o d i n g bestimmt. Bei Extrakten aus Herzgranula wurden die Brenzcatechinamine vor der fluorimetrischen Bestimmung an Aluminiumoxyd adsorbiert, bei Nebennierenmark- und Milznervengranula dagegen konnten sie ohne vorherige Adsorption an Aluminiumoxyd gemessen werden. Die während der Inkubation abgegebenen Amine lassen sich aus den Überständen wiedergewinnen.

6. Verwendete Substanzen. Aluminiumoxyd Aktivitätsstufe II der Fa. G i u l i n i , Ludwigshafen; Calcium und Magnesium als Chloride, EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) als Dinatriumsalz der Fa. M e r c k , Darmstadt; Ribonuclease der Fa. W o r t h i n g t o n , New Jersey; Reserpin: Sedaraupin der Fa. B o e h r i n g e r , Mannheim; Segontin (N-(3'-Phenylpropyl-(2'))-1,1'-diphenyl-propyl-(3) amin) als Segontinlactat der Fa. F a r b w e r k e H o e c h s t ; Guanethidin: Ismelin der Fa. C i b a A.G., Basel. Ich danke den Herstellerfirmen für die Überlassung von Sedaraupin, Segontin und Ismelin.

E r g e b n i s s e

I. Subzelluläre Verteilung der Brenzcatechinamine des Herzens und ihre Beeinflussung durch Reserpin und Guanethidin.

1. Fraktionierung von Herzhomogenaten. Die aus Herzgewebe erhaltenen Homogenate (siehe Methodik 1) wurden bei einer Temperatur von 0° C durch Differentialzentrifugieren fraktioniert. Zunächst wurde durch 30 min langes Zentrifugieren mit 2 000 g ein grobpartikuläres Sediment abgetrennt. Der Überstand 2 000 g wurde durch Differentialzentrifugieren weiter zerlegt; dabei wurde jeweils der beim vorangehenden Zentrifugationsgang gewonnene Überstand mit höherer g-Zahl - 15 000 g, 30 000 g, 60 000 g, 100 000 g und 150 000 g - 20 min zentrifugiert und das entsprechende Sediment entfernt. Im Gesamthomogenat, in den Sedimenten und im Überstand 150 000 g wurden die Brenzcatechinamine (Adrenalin + Noradrenalin bestimmt und der Amingehalt pro mg Eiweiß errechnet. Während der Quotient ng Amin / mg Eiweiß im Sediment 15 000 g und im Überstand 150 000g niedrig ist und etwa demjenigen des Gesamthomogenats

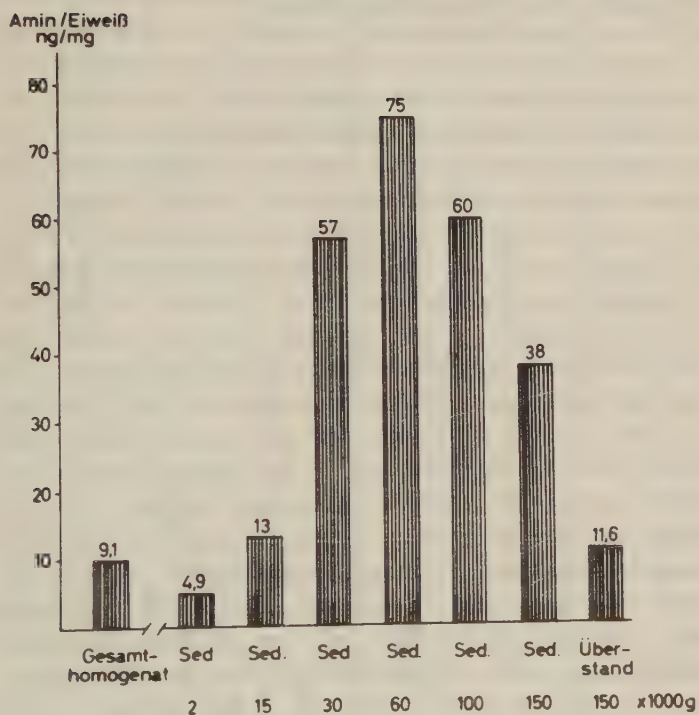


Abb. 3. Brenzcatechinamin-Eiweiß-Quotient der durch Differential-zentrifugieren aus Herzhomogenat gewonnenen Fraktionen.

entspricht, zeigen die Sedimente 30 000 g bis 150 000 g einen hohen Amin-Eiweißquotienten und enthalten somit wahrscheinlich spezifisch brenzcatechinaminspeichernde Partikel. Den niedrigsten Quotienten findet man in dem grobpartikulären Sediment 2 000 g (Abb. 3). Zur Gewinnung der brenzcatechinaminspeichernden Partikel, der " Herzgranula ", wurden die Sedimente 30 000 g bis 150 000 g zusammengefaßt, indem der Überstand 15 000 g 45 min lang mit 100 000 g zentrifugiert wurde und damit auch die Partikel sedimentierten, die bei 20 min 150 000 g niedergeschlagen werden.

2. Verteilung der Brenzcatechinamine. Das Ergebnis der Brenzcatechinamin- und Eiweißbestimmung in den so erhaltenen Fraktionen und im Gesamthomogenat ist in der Tabelle 2 dargestellt. Es wurde nicht zwischen Adrenalin und Noradrenalin differenziert. - Der größten Anteil der Amine und des Eiweißes findet sich in dem grobpartikulären Sediment 2 000 g, das neben unspezifisch adsorbierten Aminen auch spezifisch gespeicherte in Granula enthält, die in größeren Gewebsfragmenten zurückgehalten werden. Da die in diesem Sediment enthaltenen Amine sich keinen bestimmten Strukturen zuordnen lassen, wurde es bei weiteren Versuchen nicht berücksichtigt. Einen hohen Amingehalt (ng / g Herz) hat die Herzgranulafraktion Sediment 100 000 g. Auf sie entfallen 23 % der gesamten Amine. Der hohe Amingehalt dieser Fraktion entspricht ein niedriger Eiweißgehalt (mg / g Herz), so daß der Quotient ng Amin / mg Eiweiß annähernd 8 mal so groß ist wie in den übrigen Fraktionen und im Gesamthomogenat (Tabelle 2). Wenn man annimmt, daß die Verteilung der Amine ohne das Sediment 2 000 g die subzelluläre Verteilung der Brenzcatechinamine in vivo repräsentiert, so sind 49 % der gesamten Brenzcatechinamine des Herzens in den Granula gespeichert. Sediment 15 000 g, in dem sich bei der Fraktionierung von Nebennierenmarkhomogenaten der größte Teil der Amine findet (H i l l a r p , L a g e r s t e d t und N i l s o n), enthält nur 6 bzw. 14 % (ohne Sediment 2 000 g) der Amine, während 17 bzw. 37 % der Brenzcatechinamine nicht partikulär gebunden im Überstand 100 000 g vorkommen.

Bestimmt man die Brenzcatechinamine Adrenalin und Noradrenalin im Gesamthomogenat des Herzens und in den einzelnen Fraktionen getrennt (siehe Methodik 3), so erhält man eine charakteristische Verteilung (Tabelle 3). Das Gesamthomogenat enthält in Über-

Tabelle 2

Verteilung von Brenzcatechinaminen und Eiweiß auf die durch Differentialzentrifugieren gewonnenen Fraktionen des Meerschweinchenherzens. Die Werte sind pro g Herz (Frischgewicht) angegeben. Mittel aus 5 Versuchen und mittlerer Fehler des Mittelwertes. Die Zahlen in Klammern geben die prozentuale Verteilung der Amine nach Abzug von Sediment 2000g wieder.

	Brenzcatechinamine		Eiweiß		$\frac{\text{ng Amin}}{\text{mg Eiweiß}}$
	ng/g	%	mg/g	%	
Gesamt-homogenat	1175 ± 114	-	$121,5 \pm 2,8$	-	9,7
Sediment (2000g)	599 ± 38	54 (-)	$83,8 \pm 5,4$	73	7,1
Sediment (15000g)	69 ± 12	6 (14)	$7,1 \pm 1,3$	6	3,7
Sediment (100000g)	249 ± 35	23 (49)	$3,4 \pm 0,2$	3	73,2
Überstand (100000g)	190 ± 31	17 (37)	$21,2 \pm 0,6$	18	9,0
Summe der Fraktionen	1107	100 (100)	115,5	100	-

Tabelle 3 Verteilung von Noradrenalin, Adrenalin und Eiweiß auf die durch Differentialzentrifugieren Gewonnenen Fraktionen des Meerschweinchenherzens. Die Werte sind pro g Herz (Frischgewicht) angegeben. Mittel aus 3 Versuchen und mittlerer Fehler des Mittelwerts.

	Noradrenalin		Adrenalin		Eiweiß mg/g	$\frac{\mu\text{g Noradr.}}{\text{mg Eiweiß}}$	$\frac{\mu\text{g Adr.}}{\text{mg Eiweiß}}$
	ng/g	%	ng/g	%			
Gesamt-homogenat	987 $\pm$ 112	-	104 $\pm$ 13	-	120,0 $\pm$ 3,2	8,2	0,9
Sediment (15000g)	52 $\pm$ 9	14	23 $\pm$ 9	23	8,5 $\pm$ 1,6	6,1	2,7
Sediment (100000g)	255 $\pm$ 55	66	14 $\pm$ 5	14	3,5 $\pm$ 0,3	73,0	4,0
Überstand (100000g)	78 $\pm$ 5	20	64 $\pm$ 7	63	22,1 $\pm$ 1,0	3,5	2,9
Summe der Fraktionen	385	100	101	100	34,1	-	-

instimmung mit der Literatur 90 % Noradrenalin und 10 % Adrenalin (H o l t z , K r o n e b e r g u n d S c h ü m a n n). Der weitaus höhere Noradrenalinegehalt findet dabei seinen Ausdruck in einem entsprechend hohen Quotienten ng Noradrenalin/ mg Eiweiß. - Für die Noradrenalin- bzw. Adrenalinverteilung auf die einzelnen Fraktionen ergibt sich, daß der Hauptteil des Noradrenalins (66 %) auf das Sediment 100 000 g entfällt, die Hauptmenge des Adrenalins (63 %) sich dagegen im Überstand 100 000 g befindet. Die Berechnung des Adrenalin- bzw. des Noradrenalin-Eiweißquotienten ergibt, daß der Adrenalin-Eiweißquotient in allen Fraktionen praktisch gleich groß ist, d.h., daß Adrenalin wahrscheinlich unspezifisch adsorbiert ist, während Noradrenalin im Sediment 100 000 g spezifisch gespeichert ist. Der Noradrenalin-Eiweißquotient in dieser Fraktion ist mehr als 10 mal größer als in den beiden anderen Fraktionen.

6. Wirkung von Reserpin und Guanethidin. Nach Reserpin kommt es, wie seit langem bekannt ist (B e r t l e r , C a r l s s o n u n d R o s e n g r e n ; P a a s o n e n u n d K r a y e r), zu einer Abnahme der Brenzcatechinamine des Herzens. Eigene Versuche an Meerschweinchen, die während der Versuchszeit bei konstanter Raumtemperatur von 22°C gehalten wurden, ergaben, daß schon 4 µg/ kg Reserpin i.m. nach 20 Stunden den Amingehalt des Herzens um 78 % des Ausgangsgehaltes vermindern. Bestimmt man jetzt die subzelluläre Verteilung von Amin und Eiweiß, so findet man den Amingehalt in allen Fraktionen prozentual fast gleich stark herabgesetzt: um 72, 66 und 73 % (Tabelle 4). Der Eiweißgehalt der Fraktionen dagegen bleibt unverändert. Auch Versuche unter Variierung der Reserpindosis und der Einwirkungszeit hatten das gleiche Ergebnis. So verursachten 500 µg/ kg Reserpin i.m. nach 90 min eine fast 90 %ige Abnahme des Amingehaltes im Gesamthomogenat des Herzens, 100 µg/ kg Reserpin nach 30 min eine 50 %ige Abnahme. In beiden Versuchen waren alle Fraktionen in prozentual annähernd gleichem Umfang verarmt. Ein ähnliches Ergebnis hatte ein Versuch mit Guanethidin (0,3 mg/ kg i.m.): nach 20 Stunden war der Amingehalt im Gesamthomogenat ebenso wie in den einzelnen Fraktionen um 40 - 50 % vermindert. (Tabelle 5).

Tabelle 4 Brenzcatechinamin-Gehalt in ng/mg Eiweiß der Fraktionen des Meerschweinchenherzens nach Reserpin
Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes.

Reserpin $\mu\text{g/kg}$ i.m.	Zeit Std.	n	Gesamthomogenat Amin ng	Abnahme %	Sed. (15 000g) Amin ng	Abnahme %	Sed. (100 000g) Amin ng	Abnahme %	Überstand (100 000g) Amin ng	Abnahme %
-	-	6	$9,1 \pm 0,8$	-	$9,5 \pm 1,0$	-	$71,3 \pm 6,1$	-	$9,3 \pm 1,1$	-
100	1/2	1	4,4	52	4,5	53	26,6	63	4,5	52
500	$1\frac{1}{2}$	1	1,3	86	0,7	93	5,8	92	1,0	89
4	20	4	$2,0 \pm 0,1$	78	$2,7 \pm 0,6$	72	$24,5 \pm 6,5$	66	$2,5 \pm 0,6$	73

Tabelle 5 Brenzcatechinamin-Gehalt in ng/mg Eiweiß der Fraktionen des Meerschweinchenherzens 20 Std. nach Vorbehandlung mit Guanethidin (0,3 mg/kg i.m.).

Guanethidin mg/kg	n	Gesamthomogenat		Sed. (15 000g)		Sed. (100 000g)		Überstand (100 000g)	
		Amin ng	Abnahme %	Amin ng	Abnahme %	Amin ng	Abnahme %	Amin ng	Abnahme %
-	1	9,6	-	12,9	-	75,0	-	11,6	-
0,3	1	5,6	42	7,0	46	43,7	42	5,9	49

II. Freisetzung von Brenzcatechinaminen aus isolierten Herzgranula im Vergleich zu Nebennierenmark- und Milznervengranula

1. Vorbemerkung. Ein großer Teil der Brenzcatechinamine des Nebennierenmarkes ist in besonderen Zellorganellen, sogenannten chromaffinen Granula, gespeichert (Blaschko und Welch; Hillarp, Lagerstedt und Nilsson). Sie lassen sich durch Differentialzentrifugieren aus Nebennierenmarkhomogenaten gewinnen und besitzen ähnliche Sedimentationseigenschaften wie Mitochondrien, von denen sie jedoch durch Zentrifugieren über einem Dichtegradienten abgetrennt werden können. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Sjöstrand und Wetzstein; Kleinschmidt und Schümann) sind Nebennierenmarkgranula von einer Membran umgeben und haben je nach der untersuchten Tierart einen Durchmesser zwischen 150 - 250 mμ. Die Brenzcatechinamine sind fest an die Granulastruktur gebunden, so daß isolierte Nebennierenmarkgranula bei 3°C in isotonischer Saccharoselösung suspendiert selbst innerhalb einiger Tage keine bedeutenden Aminmengen abgeben (Hillarp, Lagerstedt und Nilsson). Eine Reihe von physikalisch-chemischen Faktoren, wie z.B. Temperatur, Osmolarität und pH-Wert, beeinflussen die Aminfreisetzung aus isolierten Nebennierenmarkgranula. Auch bestimmte Ionen und einige Kreislaufaktive Pharmaka sind in der Lage, die Brenzcatechinaminfreisetzung aus isolierten Granula zu steigern. - Ähnlich wie im Nebennierenmark sind auch in den sympathischen Milznerven 30 % des dort vorgefundenen Noradrenalins in Granula gespeichert (v. Euler; Schümann), die sich jedoch durch ihre geringere Größe (Durchmesser etwa 80 mμ) und ihr andersartiges Verhalten während der Inkubation von Nebennierenmarkgranula unterscheiden.

Bei der histologischen Untersuchung des Herzens wurden 2 Arten von Granula beschrieben, die möglicherweise Brenzcatechinamine speichern. So beobachtete Palade in den Muskelfasern, vor allem der Herzyvorhöfe, 100 - 250 mμ große Granula, die in ihrem Durchmesser den Nebennierenmarkgranula etwa entsprechen. Wolfe und Potter beschrieben kleinere von etwa 30 - 60 mμ Durchmesser in den postganglionären, sympathischen Nerven.

des Herzens. Um die Frage zu klären, ob es sich bei den Herzgranula um chromaffine Granula handelt, ähnlich den Nebennierenmarkgranula, oder um Granula aus postganglionären, sympathischen Nerven, wurden vergleichende Inkubationsversuche zwischen Herz-, Nebennierenmark- und Milznervengranula durchgeführt.

2. Temperaturabhängige Spontanfreisetzung. Werden isolierte Herzgranula (Sediment 100 000 g, 45 min) bei verschiedener Temperatur in isotonischer Saccharoselösung 45 min lang inkubiert, so kommt es zu einer temperaturabhängigen, spontanen Brenzcatechinaminfreisetzung (Abb. 4). Bei 0° , 22° bzw. 37°C beträgt sie im Mittel 16, 36 bzw. 100 % des Ausgangsgehaltes. Vergleichsversuche mit Nebennierenmark- (Sediment 15 000 g, 30 min) und Milznervengranula (Sediment 30 000 g 30 min) ergaben, daß die spontane Aminfreisetzung aus Herz- und Milznervengranula prozentual etwa gleich groß ist, während Nebennierenmarkgranula eine wesentlich geringere Spontanfreisetzung zeigen.

3. Osmotische Lyse. Nebennierenmarkgranula sind nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (S j ö s t r a n d und W e t z - s t e i n ; K l e i n s c h m i d t und S c h ü m a n n) von einer Membran umgeben und lassen sich durch destilliertes Wasser osmotisch lysieren (H i l l a r p und N i l s o n), wobei sie neben dem löslichen Eiweiß den größten Teil ihrer Amine abgeben. Nach eigenen Versuchen verlieren sie innerhalb von 10 min bei 0°C im Mittel $94 \pm 4\%$ ($n = 14$) ihrer Amine. Herzgranula geben unter diesen Bedingungen nur $31 \pm 5\%$ ($n = 5$) ihres Noradrenalins ab; sie verhalten sich wie Milznervengranula, die nach v. E u l e r und L i s h a j k o (1960) unter den gleichen Bedingungen 40 - 50 % ihrer Amine verlieren.

4. Calcium und Magnesium. Calcium ist für die physiologische Brenzcatechinaminsekretion des Nebennierenmarkes von Bedeutung (D o u g l a s und R u b i n ;), indem Acetylcholin, der physiologische Liberator der Markhormone, nur in Gegenwart von Calciumionen aus intakten Nebennierenmarkzellen Brenzcatechinamine freisetzen vermag. Acetylcholin, das selbst an isolierten Nebennierenmarkgranula unwirksam ist (B l a s c h k o, H a g e n und W e l c h), ermöglicht Calcium das Einströmen in die Zelle,

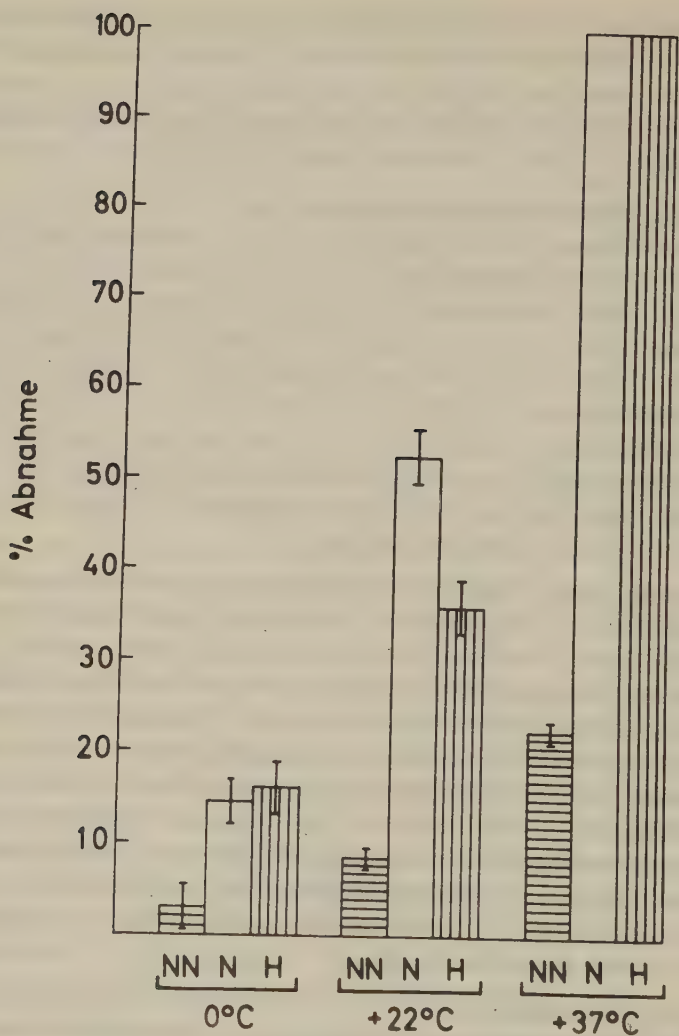


Abb. 4. Spontane Brenzcatechinaminfreisetzung aus isolierten Nebennierenmark- (NN), Milznerven- (N) und Herzgranula (H) in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Inkubation 45 min in 0,3 Saccharoselösung; Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes von mindestens je 4 Versuchen.

worauf Calciumionen die Brenzcatechinaminfreisetzung aus den aminospeichernden Granula des Nebennierenmarkes bewirken (S c h ü m a n n und P h i l i p p u). Ich habe deshalb untersucht, ob Calcium und darüber hinaus Magnesium auch einen Einfluß auf die Brenzcatechinaminabgabe aus isolierten Herz- und Milznervengranula haben.

Inkubiert man isolierte Granula 45 min lang bei 22°C in 0,3-M Saccharoselösung mit 5 $\mu\text{Mol/ml}$ Calcium, so kommt es bei Nebennierenmarkgranula zu einer deutlichen Steigerung der Aminfreisetzung auf 38,6 % gegenüber 5,5 % Spontanfreisetzung. Im Gegensatz hierzu wird die spontan erfolgende hohe Aminabgabe aus isolierten Herz- und Milznervengranula durch 5 $\mu\text{Mol/ml}$ Calcium nicht beeinflusst (Abb. 5). Selbst in 10-fach höherer Konzentration (50 $\mu\text{Mol/ml}$) hatte Calcium keine Wirkung auf die Brenzcatechinaminfreisetzung aus Herz- und Milznervengranula. - Auch bei geringer spontaner Brenzcatechinaminfreisetzung aus Herz- und Milznervengranula, die sich durch Senken der Inkubationstemperatur auf 0°C erreichen läßt (vergl. Abb. 4), war Calcium selbst in Konzentrationen von 20 und 50 $\mu\text{Mol/ml}$ nicht in der Lage, die Aminabgabe zu erhöhen. Demgegenüber genügen 5 $\mu\text{Mol/ml}$ Calcium, um aus Nebennierenmarkgranula auch bei 0°C eine deutliche Steigerung der Aminfreisetzung zu verursachen.

Magnesium (20 $\mu\text{Mol/ml}$) setzt wie Calcium (5 $\mu\text{Mol/ml}$) nur aus Nebennierenmarkgranula, nicht aber aus Herz- und Milznervengranula, Amine frei (Abb. 5).

5. Ribonuclease. Auch durch Ribonuclease läßt sich nach P h i l i p p u und S c h ü m a n n aus Nebennierenmarkgranula bei 37°C eine Freisetzung von Brenzcatechinaminen erzielen. Wegen der hohen Spontanfreisetzung der Amine aus Herz- und Milznervengranula wurden die Inkubationsversuche bei 22°C ausgeführt. Um eine deutliche Enzymwirkung zu erhalten, mußten unter diesen Bedingungen allerdings hohe Ribonuclease-Konzentrationen (1 mg/ml) verwendet werden. Als Aktivator wurden 1,5 $\mu\text{Mol/ml}$ Calcium zugesetzt, das in dieser Konzentration keine Aminabgabe verursacht.

Im Gegensatz zu Calcium und Magnesium wirkt Ribonuclease auf alle drei Granulaarten (Abb. 6).

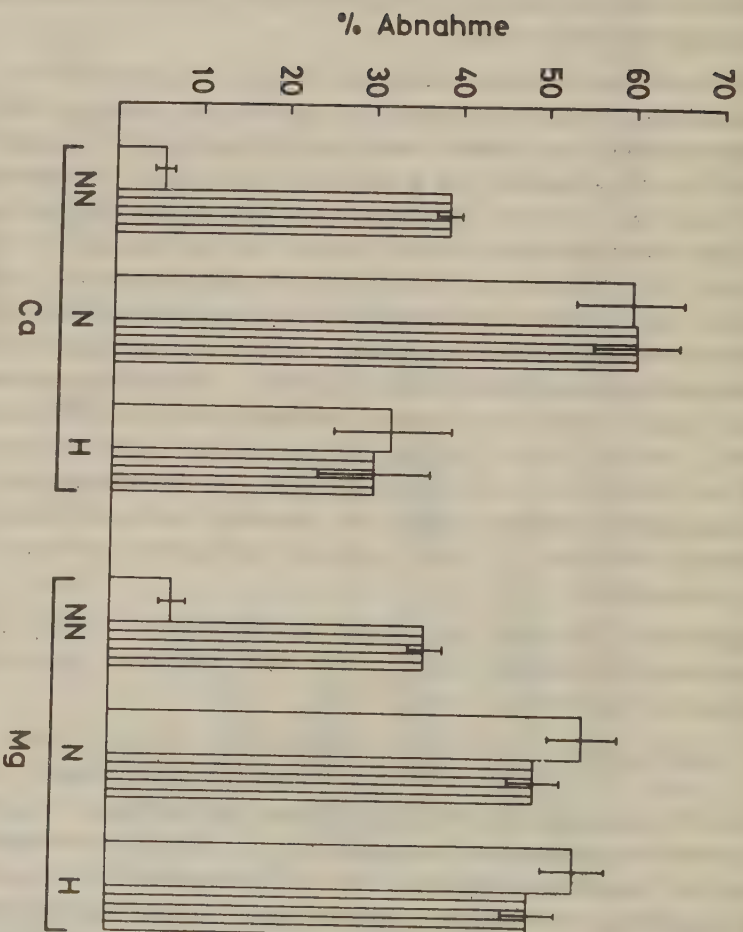


Abb. 5. Einfluss von Calcium (Ca) und Magnesium (Mg) auf die Brenzcatechinaminfreisetzung aus isolierten Nebennierenmark- (NN), Milznerven- (N) und Herzgranaula (H). Inkubation 45 min bei 22°C in 0,3 M Saccharoselösung. Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes aus je 3 Versuchen. Spontanfreisetzung = ☐ Freisetzung durch 5 $\mu\text{Mol/ml}$ Calcium bzw. 20 $\mu\text{Mol/ml}$ Magnesium = ☐

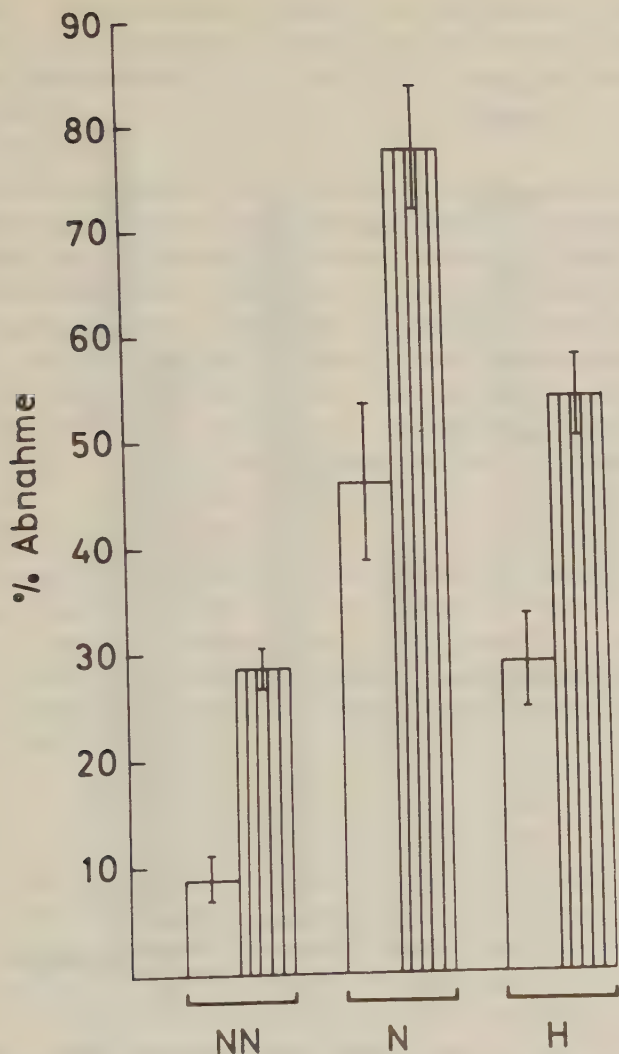


Abb. 6. Brenzcatechinaminfreisetzung aus isolierten Nebennierenmark- (NN), Milznerven- (N) und Herzgranula (H) durch Ribonuclease (1 mg/ ml). Inkubation: 45 min bei 22°C in 0,3 M Saccharoselösung. Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes aus je 3 Versuchen.
 Spontanfreisetzung =  Freisetzung durch Ribonuclease = 

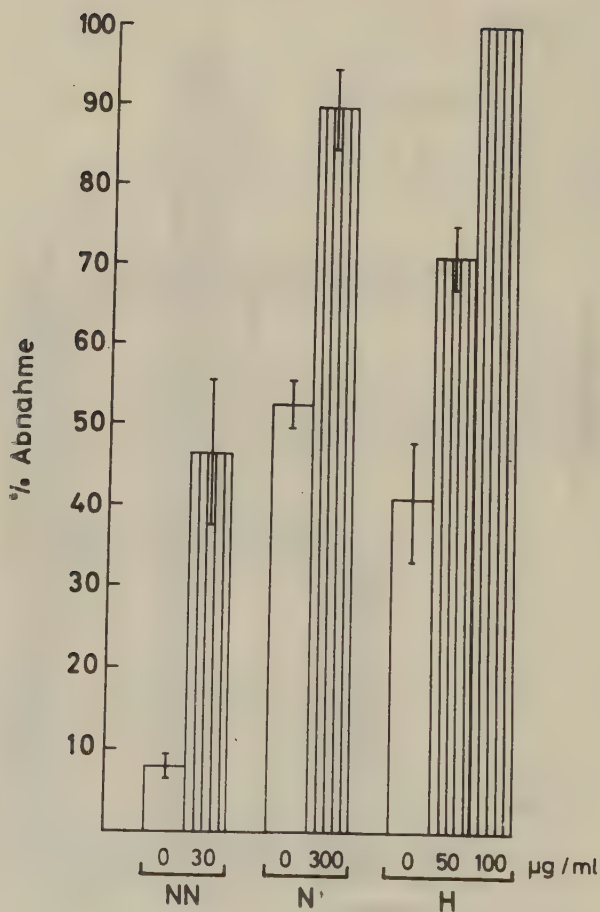


Abb. 7. Brenzcatechinaminfreisetzung aus isolierten Nebennierenmark (NN), Milznerven- (N) und Herzgranula (H) durch Segontinlactat. Inkubation 45 min bei 22°C in 0,3 M Saccharoselösung. Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes aus je 3 Versuchen.

Spontanfreisetzung =  Freisetzung durch Segontinlactat = 

6. Segontin. Vergleichende Versuche zwischen Nebennierenmark-, Milznerven- und Herzgranula wurden auch mit Segontin durchgeführt, das Nebennierenmarkgranula in vivo und in vitro an Brenzcatechinaminen verarmt (S c h ö n e und L i n d n e r; P h i l i p p u, P a l m und S c h ü m a n n).

Eigene Versuche ergaben, daß Segontin auch bei isolierten Herz- und Milznervengranula zu einer Steigerung der Brenzcatechinaminfreisetzung führt, jedoch sind höhere Konzentrationen als bei Nebennierenmarkgranula erforderlich (Abb. 7). Während Nebennierenmarkgranula schon auf 30 µg/ ml Segontinlactat mit einer starken Aminabgabe reagieren, benötigt man bei Milznervengranula eine 10-fach höhere Konzentration (300 µg/ ml), um eine vergleichbare Freisetzung zu bewirken. Herzgranula liegen mit ihrer Empfindlichkeit zwischen Nebennierenmark- und Milznervengranula, indem schon 100 µg/ ml Segontinlactat eine völlige Brenzcatechinaminverarmung herbeiführen.

7. Acetylcholin. Acetylcholin, das bekanntlich bei der Inkubation isolierter Nebennierenmark- (B l a s c h k o, H a g e n und W e l c h) und Milznervengranula (S c h ü m a n n und W e i g m a n n) keine Freisetzung der Brenzcatechinamine verursacht, erwies sich auch an Herzgranula in Konzentrationen bis zu 1 mg/ ml als unwirksam.

D i s k u s s i o n

Adrenalin und Noradrenalin werden im Nebennierenmark (B l a s c h k o und W e l c h; H i l l a r p, L a g e r s t e d t und N i l s o n) und in den postganglionären, sympathischen Milznerven (v. E u l e r und H i l l a r p; S c h ü m a n n 1958a und b) in besonderen Zellorganellen, sogenannten Granula, gespeichert. Nach Untersuchungen von K a k o und W e g m a n n an Hundeherzen sowie von P o t t e r und A x e l r o d an Rattenherzen ist ein großer Teil der Brenzcatechinamine des Herzens an eine partikuläre Fraktion gebunden.

In der vorliegenden Arbeit habe ich nachweisen können, daß sich aus Meerschweinchenherz-Homogenaten durch Differentialzentrifugieren Partikel gewinnen lassen, in denen Noradrenalin spezifisch

angereichert ist. 66 % des gesamten im Herzen vorkommenden Noradrenalins sind an die Granula des Sedimentes 100 000 g gebunden, das pro mg Eiweiß 20 mal mehr Noradrenalin enthält als der Überstand 100 000 g und 9 mal mehr als das Gesamthomogenat. Man muß deshalb annehmen, daß Herzgranula ähnlich wie Milznervengranula Noradrenalin spezifisch speichern. Demgegenüber findet sich das Adrenalin des Herzens, das nur zu 10 % an der Zusammensetzung der Gesamtbrenzcatechinamine beteiligt ist, überwiegend - zu 63 % - nicht-partikulär gebunden im Überstand der Fraktion 100 000 g und ist unspezifisch adsorbiert, wie aus dem gleich großen Adrenalin-Eiweißquotienten aller Fraktionen hervorgeht. Das Sediment 15 000 g, auf das bei der Fraktionierung von Nebennierenmark-Homogenaten 80 - 90 % der Amine entfallen, enthält bei Herzhomogenaten nur etwa 14 %.

Die prozentual gleich starke Abnahme des Amingehaltes in allen Fraktionen nach Vorbehandlung der Tiere mit Reserpin zeigt, daß am Herzen ein Gleichgewichtszustand zwischen partikulär gebundenen und nicht-partikulär gebundenen Brenzcatechinaminen besteht, der auch bei Verarmung der Gewebe an Brenzcatechinaminen unverändert beibehalten wird. Der Mechanismus der Reserpinwirkung ist nicht eindeutig geklärt, es spricht jedoch vieles dafür, daß die Brenzcatechinaminverarmung nach kleinen Reserpindosen nicht die Folge einer erhöhten Aminfreisetzung ist, sondern durch eine Blockade der Noradrenalinsynthese zustandekommt. Nach den Befunden von D e n g l e r, S p i e g e l und T i t u s hemmt Reserpin in vivo den aktiven Transport der für die Noradrenalinsynthese erforderlichen Aminosäuren und Amine in die Zellen und verursacht hierdurch eine Abnahme des Brenzcatechinamingehaltes. Es ist somit auch verständlich, daß es nicht zu einer selektiven Verarmung der noradrenalinspeichernden Granula kommt.

Nach den schon erwähnten histologischen Untersuchungen von P a l l a d e enthalten die Muskelfasern, vor allem der Herzvorhöfe, Granula, die mit einem Durchmesser von 100 - 250 μ annähernd gleich groß sind wie die Nebennierenmarkgranula und möglicherweise Brenzcatechinamine speichern. Die Sedimentationseigenschaften der Herzgranula sprechen jedoch dafür, daß es sich bei den Partikeln des Sedimentes 100 000 g nicht um die von P a l l a d e beschrie-

benen Granula handelt, sondern um kleinere mit einem Durchmesser von 30 - 60 μ , wie sie von W o l f e und P o t t e r in den postganglionären, sympathischen Nerven von Rattenherzen beobachtet wurden. Um die Frage zu entscheiden, ob die Herzgranula Nervengranula sind oder ob sie chromaffine Granula sind, ähnlich wie Nebennierenmarkgranula, wurde das Verhalten isolierter Herzgranula bei der Inkubation untersucht und mit dem von Milznerven- und Nebennierenmarkgranula verglichen.

Es zeigte sich, daß Herz- und Milznervengranula in ihrem Verhalten Gemeinsamkeiten aufweisen, die sie von Nebennierenmarkgranula unterscheiden. So sind Herz- und Milznervengranula gegenüber osmotischer Lyse resistenter und haben eine höhere Spontanfreisetzung als Nebennierenmarkgranula. Übereinstimmend läßt sich durch Segotin bei allen drei Granulaarten eine Steigerung der Brenzcatechinaminfreisetzung erzielen, während Acetylcholin sowohl bei Herzgranula als auch bei Nebennierenmarkgranula (B l a s c h k o, H a g e n und W e l c h) und Milznervengranula (S c h ü m a n n und W e i g m a n n) keinen Einfluß auf die Brenzcatechinaminabgabe hat.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Nebennierenmarkgranula und Herz- bzw. Milznervengranula besteht in ihrem Verhalten gegenüber Calcium und Magnesium, was auf eine unterschiedliche Speicherung der Brenzcatechinamine hinweist. Adrenalin und Noradrenalin werden wahrscheinlich in den Granula des Nebennierenmarkes in Form eines Amin-ATP-Komplexes gespeichert (H i l l a r p und N i l s o n), der möglicherweise mit Hilfe von Calcium und Magnesium an ein Ribonucleoproteid der Granulastruktur gebunden ist (S c h ü m a n n und P h i l i p p u). Nach den Vorstellungen dieser Autoren könnten Calcium und Magnesium aus diesem Komplex durch Ionenaustausch Brenzcatechinamine und im gleichen Verhältnis ATP freisetzen. Bei Herzgranula wie auch bei Milznervengranula sind Calcium und Magnesium unwirksam. Ob dies darin begründet ist, daß Calcium und Magnesium bei Herz- und Milznervengranula nicht an der Bildung eines Aminspeicherkomplexes teilnehmen, müssen weitere Untersuchungen klären. Die Inkubationsversuche mit Ribonuclease lassen darauf schließen, daß Ribonucleinsäuren auch bei Herz- und Milznervengranula am Aufbau der Granula-

struktur beteiligt sind. Es kann jedoch nicht entschieden werden, ob es sich bei der Aminfreisetzung durch Ribonuclease um eine unspezifische Zerstörung der Granulastruktur handelt oder ob sie deswegen zustandekommt, weil Ribonucleinsäuren bei Herz- und Milznervengranula, ähnlich wie bei Nebennierenmarkgranula, an der Bildung eines Aminspeicherkomplexes teilnehmen.

Die vergleichenden Versuche zwischen Granula aus Herz, Milznerven und Nebennierenmark ergaben, daß Herz- und Milznervengranula sich in ihrem Verhalten weitgehend ähnlich sind und sich deutlich von Nebennierenmarkgranula unterscheiden. Aufgrund der Vergleichsversuche und der vorliegenden histologischen Befunde ist es deshalb sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den Partikeln des Sedimentes 100 000 g, den Herzgranula, im wesentlichen um Granula aus postganglionären, sympathischen Nervenfasern handelt.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Homogenate von Meerschweinchenherzen wurden durch Differential-zentrifugieren fraktioniert. Läßt man das grobpartikuläre Sediment 2 000 g unberücksichtigt, so erhält man folgende Verteilung der Gesamtbrenzcatechinamine (Adrenalin + Noradrenalin) auf die einzelnen Fraktionen: Sediment 15 000 g enthält 14 %, Sediment 100 000 g 49 % und der Überstand 100 000 g 37 %. Auf mg Eiweiß berechnet enthält Sediment 100 000 g 8 mal mehr Amine als die anderen Fraktionen.

2. Noradrenalin wird zu 66 % in der Granulafraktion 100 000 g gespeichert, der Noradrenalin-Eiweißquotient in dieser Fraktion ist mindestens 10 mal so hoch wie in anderen Fraktionen. Adrenalin ist unspezifisch auf die einzelnen Fraktionen verteilt, dem Eiweißgehalt entsprechend.

3. Durch Vorbehandlung der Meerschweinchen mit Reserpin (4 µg/ kg i.m.) kommt es nach 20 Stunden zu einer 70 - 80 %igen Abnahme der Brenzcatechinamine des Herzens, die alle Fraktionen gleichmäßig betrifft. 100 µg/ kg Reserpin verursachen nach 30 min eine 50 %ige, 500 µg/ kg nach 90 min eine 90 %ige Aminabnahme in allen

Fraktionen. Die nach Guanethidin (0,3 mg/ kg i.m., 20 Std.) auftretende Verarmung von ca. 40 % betrifft alle Fraktionen prozentual gleich stark.

4. Aus Suspensionen isolierter Herzgranula (Sediment 100 000 g) in isotonischer Saccharoselösung werden bei Inkubation (45 min) in Abhängigkeit von der Temperatur Brenzcatechinamine freigesetzt, bei 0°, 22° bzw. 37°C 16, 36 bzw. 100 %. Unter den gleichen Versuchsbedingungen ist die Aminfreisetzung aus isolierten Milznervengranula etwa gleich groß, während diejenige aus isolierten Nebennierenmarkgranula wesentlich geringer ist. Durch osmotische Lyse mit aqua dest. (0°C, 10 min) verlieren Herzgranula 31 %, Nebennierenmarkgranula 94 % ihrer Amine.

5. Bei isolierten Herz- und Milznervengranula läßt sich durch Inkubation (45 min) mit 5 - 50 µMol/ ml Calcium und Magnesium sowohl bei 22°C als auch bei 0°C im Gegensatz zu Nebennierenmarkgranula keine Steigerung der Brenzcatechinaminabgabe erzielen.

6. Ribonuclease (1mg/ ml) und Segontinlactat (30 - 300 µg/ ml) setzen bei 22°C aus Herz-, Milznerven- und Nebennierenmarkgranula Amine frei. Acetylcholin (1mg/ ml) ist bei allen drei Granularten unwirksam.

7. Das unterschiedliche Verhalten von Herz-, Milznerven- und Nebennierenmarkgranula wird diskutiert und der Schluß gezogen, daß die Herzgranula (Sediment 100 000 g) im wesentlichen Granula aus postganglionären, sympathischen Nerven sind.

L i t e r a t u r

Angelakos, E.T., K. Fuxe and M.L. Torchiana: Chemical and histochemical evaluations of the distribution of catecholamines in rabbit and guinea pig hearts. Acta physiol. scand. 59 , 184 (1963)

Blaschko, H. and A.D. Welch: Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of bovine adrenal medulla. Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 219 , 17 (1953)

Blaschko, H., P. Hagen and A.D. Welch: Observations on the intracellular granules of adrenal medulla. J. Physiol. (Lond.) 129 , 27 (1955)

Bertler, A., A. Carlsson and E. Rosengren: Release by reserpine of catechol amines from rabbit's heart. Naturwissenschaften 43 , 521 (1956)

Dengler, H.J., H.E. Spiegel and O.E. Titus: Uptake of tritium-labeled norepinephrine in brain and other tissues of cat in vitro. Science 133 , 1072 (1961) .

Douglas, W.W., and R.P. Rubin: The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. J. Physiol. (Lond.) 159 , 40 (1961)

Euler, U.S.v.: The presence of a sympathomimetic substance in extracts of mammalian hearts. J. Physiol. (Lond.) 105 , 38 (1946)

Euler, U.S.v. and U. Hamberg: Colorimetric determination of noradrenaline and adrenaline. Acta physiol. scand. 19 , 74 (1949)

Euler, U.S.v. and N.A. Hillarp: Evidence for the presence of noradrenaline in submicroscopic structures of adrenergic axons. Nature (Lond.) 177 , 44 (1956)

Euler, U.S.v. and J. Floding: A fluorimetric micro-method for differential estimation of adrenaline and noradrenaline. Acta physiol. scand. 45 , 122 ; (1959)

Euler, U.S.v. and F. Lishajko: Noradrenaline release from isolated nerve granules. Acta physiol. scand. 51 , 193 (1961)

- c G o o d a l l, C.: Studies of adrenaline and noradrenaline in mammalian heart and suprarenals. *Acta physiol. scand.* 24 , Suppl. 15 (1951)
- F i l l a r p, N.A., S. L a g e r s t e d t and B. N i l s o n: The isolation of a granular fraction from suprarenal medulla containing sympathomimetic catecholamines. *Acta physiol. scand.* 29 , 251 (1953)
- F i l l a r p, N.A. and B. N i l s o n: The structure of the adrenaline and noradrenaline containing granules in the adrenal medullary cells with reference to the storage and release of the sympathomimetic amines. *Acta physiol. scand.* 31 , 79 (1954)
- H ö k f e l t, B.: Noradrenaline and adrenaline in mammalian tissues. Distribution under normal and pathological conditions with special reference to the endocrine system. *Acta physiol. scand.* 25 , Suppl. 92 (1951)
- H o l t z, P., G. K r o n e b e r g und H.J. S c h ü m a n n: Über die sympathicomimetische Wirksamkeit der Herzmuskelextrakte. *Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 212 , 551 (1951)
- J a m e s, O.W.: Demonstration and separation of noradrenaline, adrenaline and methyladrenaline. *Nature (Lond.)* 161 , 851 (1948)
- K l e i n s c h m i d t, A. und H.J. S c h ü m a n n: Strukturuntersuchungen über die Adrenalin und Noradrenalin speichernden Granula des Nebennierenmarkes. *Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 241 , 260 (1961)
- K l o u d a, M.A.: Distribution of catecholamines in the dog heart. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.* 112 , 728 (1963)
- K o p i n, I.J. and E.K. G o r d o n: Origin of norepinephrine in the heart. *Nature (Lond.)* 199 , 1289 (1963)
- L u n d, A.: Fluorimetric determination of adrenaline in blood. I. Isolation of the fluorescent oxydation product of adrenaline. *Acta pharmacol. toxicol.* 2 , 75 (1949a)
- L u n d, A.: Fluorimetric determination of adrenaline in blood. II. The constitution of adrenolutine (the fluorescent oxydation product of adrenaline). *Acta pharmacol. toxicol.* 5 , 121 (1949b)

- M u s a c c h i o, J.M. and M. G o l d s t e i n: Biosynthesis of norpinephrine and norsynephrine in the perfused rabbit heart. J. Biochem. Pharmacol. 12 , 1061 (1963)
- M u s c h o l l, E.: Die Konzentration von Noradrenalin und Adrenalin in den einzelnen Abschnitten des Herzens. Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 237 , 350 (1959).
- P a a s o n e n, M.K. and O. K r a y e r: The release of nor-epinephrine from mammalian heart by reserpine. J. Pharmacol. 123 , 153 (1958)
- P a l a d e, G.E.: Secretory granules in the atrial myocardium. Anat. Rec. 139 , 262 (1961)
- P h i l i p p u, A. and H.J. S c h ü m a n n: Effect of ribonuclease on the ribonucleic acid, adenosine triphosphate and catecholamine content of medullary granules. Nature (Lond.) 198 , 795 (1963)
- P h i l i p p u, A., D. P a l m and H.J. S c h ü m a n n: Effect of segontin and reserpine on isolated medullary granules. Nature (Lond.) (im Druck)
- P o t t e r, L.T. and J. A x e l r o d: Intracellular localization of catecholamines in tissues of the rat. Nature (Lond.) 194 , 581 (1962)
- S c h ö n e, H.H., und E. L i n d n e r: Über die Wirkung von N-(3'-Phenyl-propyl-(2'))-1,1-diphenyl-propyl (3) amin auf den Katecholaminstoffwechsel. Klin. Wschr. 40 , 1196 (1962)
- S c h ü m a n n, H.J.: Über den Noradrenalin- und ATF-Gehalt sympathischer Milznerven. Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 233 , 296 (1958a)
- S c h ü m a n n, H.J.: Über die Verteilung von Noradrenalin und Hydroxytyramin in sympathischen Nerven (Milznerven). Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 234 , 17 (1958b)
- S c h ü m a n n, H.J. und E. W e i g m a n n: Über den Angriffspunkt der indirekten Wirkung sympathicomimetischer Amine. Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 240 , 275 (1960)

Schümann, H.J. und A. Philippu: Zum Mechanismus
der durch Calcium und Magnesium verursachten Freisetzung der Neben-
nierenmarkhormone. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.
4, 466 (1963)

Jöstrand, F.S. und R. Wetzstein: Elektronen-
mikroskopische Untersuchungen der phaeochromen (chromaffinen)
Granula in den Markzellen der Nebenniere. Experientia (Basel)
12, 196 (1956)

Hehr, L.: Pharmakologische Methoden. Wissenschaftliche Ver-
lagsgesellschaft m.b.H. Stuttgart 1949

Logg, M.: The secretion of the denervated adrenal medulla of
the cat. Brit. J. Pharmacol. 7, 325 (1952)

Legmann, A. and K. Kakó: Particle-bound and free
catecholamines in dog hearts and the uptake of injected norepine-
phrine. Nature (Lond.) 192, 978 (1961)

Colfe, D.E., and L.T. Potter: Localization of nor-
epinephrine in the atrial myocardium. Anat. Rec. 145, 301 (1963)

Für die mir an seinem Institut gewährte Arbeitsmöglichkeit und das
überlassene Versuchsmaterial danke ich Herrn Prof. Dr. med. P.
Soltz.

Herrn Prof. Dr. med. H.J. Schümann danke ich für das
Thema meiner Dissertation sowie für seine Anregungen und seine
jederzeit freundlich gewährte Unterstützung bei der Durchführung
der Versuche.

Wichtige Hinweise verdanke ich auch den Diskussionen mit Herrn Dr.
H. Philippu und Herrn Dr. med. H. Grobceker.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Prof. Dr. R. A l t m a n n	Innere Medizin
Prof. Dr. W. A m e l u n g	Innere Medizin
Prof. Dr. W. Artelt	Geschichte der Medizin
Priv. Doz. Dr. B e c k	Musikwissenschaften
Prof. Dr. H. B e t k e	Hygiene und Arbeitsmedizin
Prof. Dr. H. G. B o e n n i n g h a u s	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
Prof. Dr. B r a u e r	Chemie
Prof. Dr. W. C r a m e r	Philosophie
Priv. Doz. Dr. R. D e g k w i t z	Neurologie und Psychiatrie
Prof. Dr. P. D u u s	Neurologie und Psychiatrie
Prof. Dr. D u b r a u s k y	Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. F e l i x	Physiologische Chemie
Priv. Doz. Dr. F i s c h e r	Anatomie
Prof. Dr. H. F r i c k	Anatomie
Prof. Dr. R. F r o w e i n	Neurologie und Psychiatrie
Prof. Dr. M. G ä n s s l e n	Innere Medizin
Prof. Dr. A. G e b a u e r	Röntgenologie
Prof. Dr. R. G e i ß e n d ö r f e r	Chirurgie
Prof. Dr. G ö ß w a l d	Zoologie
Prof. Dr. K. G o e r t t l e r	Anatomie
Prof. Dr. G r u n s k y	Mathematik
Prof. Dr. E. G ü n t z	Orthopädie
Prof. Dr. R. H e i n t z	Innere Medizin
Prof. Dr. L. H e l l e r	Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. K. H e r z b e r g	Hygiene
Prof. Dr. F. H o f f	Innere Medizin
Prof. Dr. P. H o l t z	Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. J. J ü r g e n s	Innere Medizin
Prof. Dr. G. K a h l a u	Pathologie
Priv. Doz. Dr. G. K a b e l i t z	Innere Medizin
Prof. Dr. K e l l e r	Anatomie
Prof. Dr. K o e h l e r	Zoologie
Prof. Dr. G. K r o n e b e r g	Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. We. K r ü c k e	Neuropathologie
Prof. Dr. A. v. K ü g e l g e n	Anatomie
Prof. Dr. H. K ü h n e	Chirurgie
Prof. Dr. K u l e n k a m p f f	Physik
Prof. Dr. K u l e n k a m p f	Anatomie
Prof. Dr. E. L a n d e s	Dermatologie
Prof. Dr. H. L a p p	Pathologie
Prof. Dr. G. L e o n h a r d i	Dermatologie
Prof. Dr. H. L e w i n	Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. L ü d t k e	Zoologie
Prof. Dr. L ü t t r i n g h a u s	Chemie
Priv. Doz. Dr. H. M a r t i n	Innere Medizin
Prof. Dr. R. M i t t e r m a i e r	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
Prof. Dr. K. N e u b e r t	Anatomie
Prof. Dr. N e u m a n n	Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. O e h l k e r s	Botanik
Prof. Dr. O r s i n g e r	Mathematik
Prof. Dr. O r t m a n n	Anatomie
Prof. Dr. J. E. Ö t t o	Augenheilkunde
Prof. Dr. K. L. R a d e n b a c h	Innere Medizin
Prof. Dr. B. R a j e w s k i	Physikalische Grundlagen der Medizin
Prof. Dr. J. v. R e c k o w	Zahnheilkunde
Prof. Dr. W. R i e d	Chemie

Prof. Dr. P. Royen	Chemie
Prof. Dr. W. Rötter	Pathologie
Prof. Dr. Ruffin	medizinische Psychologie
Prof. Dr. Sandritter	Pathologie
Prof. Dr. Schaaf	Philosophie
Prof. Dr. Schmidt	Physik
Prof. Dr. O. Schmith	Sozialhygiene
Prof. Dr. Schneider	Innere Medizin
Priv. Doz. Dr. R. Schneider	Anatomie
Prof. Dr. Schumacher	Geschichte der Medizin
Prof. Dr. H. J. Schümann	Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. H. Schwab	Neurologie und Psychiatrie
Prof. Dr. A.W. Schwenzer	Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. D. Starck	Anatomie
Prof. Dr. Steuder	Musikwissenschaften
Prof. Dr. F. Strnad	Röntgendiagnostik
Prof. Dr. R. Thiel	Augenheilkunde
Prof. Dr. W. Thorn	Physiologie
Prof. Dr. Wagner	Philosophie
Prof. Dr. Wachsmuth	Chirurgie
Prof. Dr. K. Weiße	Kinderheilkunde
Prof. Dr. H. Westermann	Chirurgie
Prof. Dr. K. Wezler	Physiologie
Priv. Doz. Dr. E. Wiedemann	Physikalische Therapie
Prof. Dr. Th. Wieland	Chemie
Prof. Dr. Wiethold	Gerichtsmedizin
Priv. Doz. Dr. G. Wilhelm	Kinderheilkunde
Prof. Dr. Wüstenfeld	Anatomie
Prof. Dr. J. Zutt	Neurologie und Psychiatrie

Lebenslauf

Ich bin am 20. November 1936 in Frankfurt am Main geboren als Sohn des Diplomkaufmannes Friedrich Michael Schnell. Zusammen mit meinen beiden jüngeren Geschwistern verließ ich 1942 Frankfurt, war zunächst in Rheinhessen und später in Unterfranken, wo ich im Herbst 1942 eingeschult wurde. Nach Ende des Krieges kehrten wir nach Frankfurt am Main zu unseren Eltern zurück. Hier besuchte ich seit Herbst 1946 die Wöhler-Schule und legte im März 1956 die Reifeprüfung ab.

Im Frühjahr 1956 begann ich an der Universität Freiburg mit dem Studium der Medizin. Während des Sommersemesters 1957 war ich in Frankfurt immatrikuliert und ging anschließend nach Würzburg, wo ich am 30. Oktober 1958 die ärztliche Vorprüfung mit " gut " ablegte. Ab Sommersemester 1959 studierte ich wieder an der Universität Frankfurt und bestand hier am 16. Juli 1963 die ärztliche Prüfung mit dem Prädikat " sehr gut ". Gleichzeitig arbeitete ich seit 1960 an meiner Dissertation im Pharmakologischen Institut der Universität und leistete nach dem Staatsexamen 8 Monate meiner Medizinalassistentenzeit an diesem Institut ab. Augenblicklich bin ich als Medizinalassistent an der Chirurgischen Klinik des St. Markus-Krankenhauses in Frankfurt tätig.

Frankfurt am Main, Juli 1964

Klaus Schnell

E r k l ä r u n g

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel " Speicherung der sympathischen Überträgerstoffe im Meerschweinchenherzen " im Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H.J. Schümann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wird als Dissertation in der vorgeschriebenen Auflagenhöhe veröffentlicht.

Frankfurt/Main, Juli 1964

Klaus Schnell

